

Л.Н. Маслов<sup>1</sup>, Ю.К. Подоксенов<sup>1</sup>, А.Г. Портниченко<sup>2</sup>, А.В. Наумова<sup>3</sup><sup>1</sup> НИИ кардиологии СО РАМН, Томск, Российская Федерация<sup>2</sup> Институт физиологии им. А.А. Богомольца, НАН Украины, Киев<sup>3</sup> Отдел радиологии, Университет Вашингтона, Сиэтл, США

## Гипоксическое preconditioning стволовых клеток как новый подход к повышению эффективности клеточной терапии инфаркта миокарда

В последнее десятилетие исследование стволовых клеток развивается ускоренными темпами. Различные типы стволовых клеток использовались для терапии инфаркта миокарда. Несмотря на положительный эффект доклинических исследований, успех клинических исследований был незначителен. Существенными препятствиями для регенерации инфарктированного миокарда являются следующие: 1) далеко не каждый тип стволовых клеток может дифференцироваться в кардиомиоциты; 2) низкая выживаемость трансплантированных клеток в суровом микроокружении инфарктированного миокарда. Гипоксическое preconditioning (ГП) повышает эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и сердечных клеток-предшественников при терапии экспериментальных моделей инфаркта миокарда. Показано, что трансплантация preconditioning-стволовых клеток уменьшает размер инфаркта, препятствует постинфарктному ремоделированию сердца, оказывает позитивный эффект на течение экспериментальной ишемической кардиомиопатии. Гипоксическое preconditioning предупреждает некроз и апоптоз стволовых клеток в условиях тяжелой длительной гипоксии или окислительного стресса. Защитный эффект ГП связывают с тремя основными процессами: 1) формированием фенотипа клетки, обеспечивающего выживаемость в условиях гипоксии (усиление экспрессии HIF-1α, активация ERK1/2-киназы, Akt-киназы, усиление экспрессии рецепторов эритропоэтина и продукции эритропоэтина, повышение уровня антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-xL); 2) увеличением продукции факторов роста (VEGF, HGF), экспрессии VEGF-2-рецептора и HGF-рецептора; 3) усилением формирования рецепторов CXCR4 и CXCR7, которые обеспечивают хоминг стволовых клеток в зону ишемии.

**Ключевые слова:** сердце, ишемия, стволовые клетки, гипоксическое preconditioning.  
(Вестник РАМН. 2013; 12: 16–25)

Одним из наиболее частых осложнений инфаркта миокарда (ИМ) является постинфарктное ремоделирование сердца, которое приводит к развитию сердечной недостаточности у значительного процента пациентов, перенесших ИМ [1]. Так, через 30 дней после ИМ у 18% больных развивается сердечная недостаточ-

ность [2]. В дальнейшем этот показатель увеличивается. По данным S.D. Solomon и соавт. [3], через 2 года после ИМ хроническая сердечная недостаточность развивается у 30% больных сахарным диабетом и у 17% пациентов без такового. Согласно результатам клинических наблюдений А.М. Richards и соавт. [4], через 5 месяцев после

L.N. Maslov<sup>1</sup>, Yu.K. Podoksenov<sup>1</sup>, A.G. Portnichenko<sup>2</sup>, A.V. Naumova<sup>3</sup><sup>1</sup> Research Institute for Cardiology of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russian Federation<sup>2</sup> Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiiiv<sup>3</sup> Department of Radiology, University of Washington, Seattle, USA

## Hypoxic Preconditioning of Stem Cells as a New Approach to Increase the Efficacy of Cell Therapy for Myocardial Infarction

During the last decade, stem cell research has developed at an accelerated pace. Various types of stem cells have been tested for myocardial infarction therapy. Despite the preclinical benefits of cell therapy success in clinical trials remains modest. The main obstacles to regeneration of the infarcted heart using stem cells are: 1) not every stem cell type can differentiate into cardiomyocytes; and 2) low survival rates of transplanted cells, due to the harsh environment of the infarcted myocardium. Hypoxic preconditioning (HP) has been shown to improve transplantation efficacy of mesenchymal stem cells and cardiac progenitor cells in animal models of myocardial infarction. It has also been shown that transplantation of preconditioned cells decreases infarct size, prevents postinfarction remodeling of the heart, and positively modulates development of ischemic cardiomyopathy. Hypoxic preconditioning also prevents extensive death of transplanted cells due to necrosis and apoptosis during long-term hypoxia or oxidative stress. The protective effect of HP is based on three main processes: (1) modification of cell phenotypes to help survival during hypoxia (enhancement of HIF-1α expression, ERK1/2 and Akt activation, enhancement of erythropoietin receptor expression and erythropoietin production, and an elevation in levels of antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL); (2) upregulation of various secretory factors including the vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF), and expression of VEGF-2 and HGF-receptors; (3) enhancement in the formation of CXCR4 and CXCR7 receptors, which play an important role in mobilization and homing of stem cells in the ischemic region.

**Key words:** heart, ischemia, stem cells, hypoxic preconditioning.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 12: 16–25)

ИМ сердечная недостаточность формируется у 33% пациентов с артериальной гипертензией (АГ) и у 24% больных с нормальным артериальным давлением. Даже восстановление перфузии в зоне инфаркта после эффективной коронарной ангиопластики не способно предотвратить развитие постинфарктного ремоделирования сердца. Результаты клинических наблюдений итальянских кардиологов [5] свидетельствуют о том, что постинфарктное ремоделирование левого желудочка (ЛЖ) через 6 месяцев после ИМ выявляется у 25% пациентов с успешным чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ). По данным польских кардиологов [6], ремоделирование сердца после ИМ наблюдается у 10% больных с успешным ЧКВ и у 28% пациентов с малоэффективным ЧКВ (феномен «no reflow»).

Известно, что сердце взрослого человека обладает ограниченной способностью к регенерации по сравнению с другими органами, такими как скелетная мускулатура, печень, кожа, кости и т.д. В норме митотический индекс для миокарда невелик и в миокарде мыши составляет 0,0005% от числа всех кардиомиоцитов желудочков [7]. Для миокарда человека этот показатель составляет 11 делящихся кардиомиоцитов на 1 миллион клеток или 59 000 делящихся клеток в левом желудочке [8]. В экспериментальных исследованиях на животных было показано, что ИМ приводит к усилению пролиферативной активности кардиомиоцитов в перинфарктной зоне [9, 10]. Увеличение пролиферативной активности кардиомиоцитов найдено и в миокарде людей, умерших через 4–12 дней после перенесенного ИМ [10]. В перинфарктной зоне митотический индекс составлял 800 митотических клеток на миллион, в межжелудочковой перегородке — 300, а в миокарде контрольной группы — 11 [10]. К сожалению, в очаге некроза делятся главным образом фибробласты, которые устойчивы к гипоксии, поэтому на месте инфаркта формируется рубец, а не здоровый миокард. До последнего времени оставалось неясным, делятся ли кардиомиоциты взрослых особей или у них пролиферирует сравнительно небольшая группа клеток-предшественников кардиомиоцитов.

Исследования на трансгенных мышах, проведенные P.C. Hsieh и соавт., показали, что регенерация сердца млекопитающих происходит за счет пролиферации и дифференцировки стволовых клеток или резидентных клеток-предшественников кардиомиоцитов, а не за счет митотического деления полностью дифференцированных кардиомиоцитов [11]. Несмотря на доказанное существование резидентных клеток-предшественников кардиомиоцитов, собственной регенеративной активности сердца не достаточно для полного восстановления структуры и сократительной функции поврежденного органа после ИМ. Современные методы лечения инфаркта помогают восстановить перфузию в инфарктированном миокарде и стабилизировать состояние больного, но они не способны восстановить утраченные кардиомиоциты. Ишемические и реперфузионные повреждения сердца после ИМ развиваются стремительно. Так, по данным чешских кардиологов, обширный очаг инфаркта возникает у крыс даже после 20-минутной коронароокклюзии и реперфузии сердца [12], поэтому не удивительно, что постинфарктное ремоделирование сердца обнаруживается даже у пациентов с восстановлением коронарной перфузии в зоне ишемии.

Трансплантация стволовых клеток (СК) является наиболее многообещающим методом восстановления структуры и функции сердечной мышцы после ИМ. Первые попытки пересадки клеток в зону инфаркта миокарда

были предприняты около 20 лет назад [13–15]. С тех пор клеточная терапия стремительно развивается. Различные типы стволовых клеток были предложены в качестве терапевтических, но результаты клинических исследований оказались не столь впечатляющими, как того бы хотелось. Значительный интерес представляли исследования по пересадке в миокард СК костного мозга. Так, было показано, что СК гематопоэтической фракции клеток костного мозга, а также стромальные клетки (мезенхимальные стволовые клетки) могут дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиоциты и клетки гладкой мускулатуры кровеносных сосудов [16–19]. Однако последующие исследования показали, что СК костного мозга не дифференцируются в кардиомиоциты [20–22]. Точка зрения о том, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются плюрипотентными, то есть способными дифференцироваться в любые другие клетки, сейчас считается ошибочной [23]. Многие исследователи полагают [22, 24–27], что улучшение сократительной функции поврежденного сердца после трансплантации стволовых клеток происходит опосредованно через стимуляцию секреции паракринных факторов, способствующих выживанию кардиомиоцитов и формированию новых кровеносных сосудов в области поврежденной ткани. К подобным факторам относятся vascular endothelial growth factor (VEGF) [24, 26, 27], белок Sfrp2 (secreted frizzled related protein 2) [25], ангиопоэтин-2 [26]. Нужно подчеркнуть, что, по данным J.L. Abkowitz и соавт. [28], 99,9% клеток костного мозга не являются плюрипотентными стволовыми клетками, а являются полудифференцированными клетками-предшественниками гранулоцитов и других гематопоэтических клеток. В 2010 г. K.E. Hatzistergos и соавт. опубликовали результаты своих исследований [29], посвященных изучению эффективности пересадки МСК костного мозга свиней-самцов в зону инфаркта и перинфарктную зону свиней-самок через 3 дня после коронароокклюзии. Авторы этой работы показали, что после трансплантации МСК начинают дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиоциты и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов. Пересадка вызывает увеличение в миокарде реципента собственных кардиальных стволовых клеток (cardiac stem cells) в 20 раз. Количество делящихся кардиомиоцитов увеличивается в 4 раза. В экспериментах *in vitro* было показано, что МСК усиливают пролиферацию кардиальных СК и их дифференцировку в кардиоциты [29], которые проявляют высокое сходство с кардиомиоцитами, но в отличие от последних обладают высоким пролиферативным потенциалом. Возможно, что в реализации названных эффектов МСК принимают участие вышеперечисленные паракринные факторы.

Результаты исследований циркулирующих в крови СК показали возможность включения этих клеток в ткань миокарда. В частности, было показано, что у мышей-самок линии mdx, страдающих врожденной кардиомиодистрофией, трансплантация клеток костного мозга от здоровых самцов-доноров приводит к ослаблению признаков кардиомиодистрофии [30]. Через 70 дней после пересадки костного мозга в миокарде мышей-реципиентов удается обнаружить кардиомиоциты, содержащие Y-хромосому [30]. В случае если трансплантация клеток самцов проводилась здоровым мышам-самкам, то в миокарде не удается обнаружить клетки, имеющие Y-хромосому [30]. В данной работе было впервые показано, что СК костного мозга могут поступать в кровяной ток и мигрировать в поврежденный миокард [30]. Несомненный интерес вызвала клиническая работа, вы-

полненная под руководством J. Kajstura и P. Anversa [31]. Исследование проводилось на аутопсийном материале, полученном от 8 пациентов-мужчин, которым было пересажено сердце женщин-доноров [31]. Интервал времени от момента трансплантации до момента смерти колебался от 4 до 552 дней [31]. Оказалось, что в пересаженных женских сердцах 9% кардиомиоцитов, 10% артериол и 7% капилляров содержали Y-хромосому [31]. Эти клетки не имели специфических антигенных маркеров, характерных для миелоидных, лимфоидных и эритроидных клеток, поэтому появление в миокарде клеток, имеющих Y-хромосому, нельзя объяснить методической погрешностью, реакцией отторжения или лейкоцитарной инфильтрацией [31]. Обнаруженное явление авторы назвали химеризмом, а донорское сердце, состоящее из клеток донора и реципиента, — химерным [31]. Исследование было выполнено на небольшом клиническом материале, что не позволило авторам выполнить корреляционный анализ. Однако они отмечают, что химеризм достигал максимального значения у тех пациентов, которые умерли через 4–28 дней после трансплантации, а минимальные значения он имел у людей, скончавшихся на 396-й и 552-й день после пересадки [31]. Интенсивность пролиферации оценивали по количеству клеток, экспрессирующих белок Ki-67, который участвует в репликации ДНК и присутствует только в делящихся клетках [31]. Оказалось, что 17% клеток мужского происхождения содержат этот белок [31]. Данный факт позволил авторам сделать вывод, что клетки реципиента активно пролиферируют в донорском сердце, и предположить, что дифференцированные клетки сердца, имеющие Y-хромосому, являются потомками стволовых клеток реципиента, которые мигрировали из кровотока в миокард [31]. Авторы другой работы также попытались количественно оценить химеризм донорского сердца и нашли, что количество Y-хромосома-позитивных кардиомиоцитов реципиента в миокарде донора составляет не более 1% [32]. Однако даже эта цифра подтверждает миграцию СК реципиента в донорское сердце.

Наибольшее внимание среди экспериментаторов и клиницистов заслужила моноклеарная фракция клеток костного мозга, которая содержит до 2% гемопоэтических СК и до 0,05% мезенхимальных СК [33, 34]. Немаловажную роль в этом выборе сыграл и тот факт, что моноклеарные клетки костного мозга (МНКМ) уже несколько десятилетий используются в трансплантологии, поэтому технология их выделения и пересадки хорошо отработана. После успешной тромболитической терапии немецкие кардиологи попытались оценить клиническую эффективность аутологичных МНКМ, которые пересаживали с помощью интракоронарного катетера пациентам с инфарктом миокарда через 5–10 дней от момента его возникновения [33, 35]. По данным радионуклидной вентрикулографии и добутаминовой эхокардиографии через 3–4 месяца после клеточной терапии у этих пациентов отмечалось улучшение сократимости миокарда, достоверное по отношению к контрольной группе пациентов без клеточной имплантации [33, 35]. Сцинтиграфия миокарда с использованием  $^{201}\text{TlCl}$  свидетельствовала об уменьшении размеров очагов гипоперфузии, что авторами рассматривается как доказательство неоангиогенеза [33]. Интракоронарный доплер позволил зафиксировать увеличение коронарного резерва в инфарктсвязанной артерии, что также говорит об усилении неоангиогенеза в зоне инфаркта [35]. Позитронная эмиссионная томография с  $^{18}\text{F}$ -дезоксиглюкозой позволила зафиксировать увеличение миокардиальной тка-

ни в зоне некроза [35]. Подобное усиление включения  $^{18}\text{F}$ -дезоксиглюкозы может быть как результатом регенерации миокарда, так и следствием его гипертрофии. Наш институт также включился в эти исследования. В 2006 г. нами были опубликованы результаты клинических наблюдений 26 пациентов с ИМ (в основной группе — 16, в контрольной — 10) [36]. Аутологичные МНКМ вводили интракоронарно после стентирования инфарктсвязанной коронарной артерии на 7–21-й день от момента начала болезни. Для оценки распределения МНКМ их метили с помощью радиофармпрепарата  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -НМРАО. Для оценки перфузии миокарда использовали сцинтиграфию сердца с  $^{199}\text{TlCl}$ , которую осуществляли через 2 недели и 6 месяцев после инфузии моноклеарных клеток [36]. Через 30 минут после инъекции меченых МНКМ в миокарде выявляется 7,8% от общего количества меченых клеток, через 2,5 ч — 6,8%, через 24 ч — 3,2% [36, 37]. Этот факт свидетельствует о том, что меченые МНКМ фиксируются в инфарктированном миокарде после возобновления кровотока в инфарктсвязанной коронарной артерии [36]. Следовательно, были все основания ожидать положительный эффект клеточной терапии на сократимость ЛЖ и коронарную перфузию. Однако повторное обследование больных через 6 месяцев после ИМ не выявило ни достоверного увеличения фракции выброса ЛЖ (ФВ ЛЖ), ни достоверного уменьшения величины стабильного дефекта перфузии [36, 38, 39]. Согласно данным других исследователей, пересадка аутологичных МНКМ далеко не у всех обследованных пациентов оказывает положительный эффект на сократимость миокарда [33, 35, 40, 41].

Таким образом, результаты клинических наблюдений свидетельствуют о низкой эффективности применения клеток костного мозга для регенерации инфаркта миокарда. Мы, как и ряд других авторов [42, 43], связываем данный факт с тем, что пересаженные СК в зоне инфаркта попадают в условия гипоксии, которая препятствует их пролиферации и дифференцировке, поэтому клеточная терапия оказывается малоэффективной. Вместе с тем некоторые авторы полагают, что для физиологических ниш (прежде всего костного мозга и жировой ткани), которые занимают мезенхимальные стволовые клетки, характерна умеренная гипоксия [44–47]. Следовательно, можно думать о том, что причиной неудач при клеточной терапии ИМ является неблагоприятное клеточное микроокружение, в которое попадают СК в зоне ишемии-реперфузии. Некоторые исследователи полагают, что низкая эффективность клеточной терапии ИМ связана с нарушением захвата (хоминг) СК ишемизированной тканью сердца [48]. Казалось бы, такое предположение противоречит данным клинических наблюдений об аккумуляции меченых МНКМ в зоне инфаркта [36, 37]. Однако следует отметить, что количество СК в популяции МНКМ не превышает 2% от общего количества клеток костного мозга [33, 34]. В связи с этим возможно, что наблюдаемая сцинтиграфическая картина хоминга МНКМ в миокарде связана с накоплением в зоне инфаркта меченых лейкоцитов, а не СК, поскольку инфарктированный миокард является также зоной воспаления.

Одним из возможных подходов, направленных на повышение устойчивости клеток к воздействию гипоксии, ишемии и реперфузии, является гипоксическое preconditionирование (ГП), то есть повышение устойчивости органов и клеток к действию длительной гипоксии-реоксигенации после воздействия нескольких сеансов кратковременной гипоксии-реоксигенации [49, 50]. Авторы некоторых статей, о которых речь пойдет

ниже, гипоксическим preconditionированием называют однократное воздействие длительной гипоксии.

В 2003 г. Т. Akita и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов, выполненных *in vitro* на МНКМ человека, которые имели способность дифференцироваться в клетки-предшественники эндотелиоцитов (КПЭ) [51]. Часть клеток инкубировалась в течение 7 дней в условиях нормоксии, другая подвергалась ежедневному воздействию 10-минутной аноксии. Оказалось, что ГП способствует дифференцировке МНКМ в клетки-предшественники эндотелиоцитов. Этот процесс сопровождается увеличением в среде инкубации клеток концентрации VEGF, появлением на мембране клеток-маркеров (антиген CD31 и VEGF2-рецептора), характерных для эндотелиальных клеток. Селективная блокада тирозинкиназной активности VEGF2-рецептора с помощью ингибитора SU1498 супрессирует дифференцировку МНКМ в КПЭ. После трансплантации preconditionированных КПЭ в ишемизированную ткань задних конечностей иммунодефицитных крыс наблюдалось значительное ускорение формирования новых кровеносных сосудов (неоваскуляризация) [51]. Очевидно, что события развиваются следующим образом: ГП → VEGF → VEGF2-рецептора → дифференцировка МНКМ в КПЭ.

Интересные данные получили R. Uemura и соавт., выполнявшие свои исследования на СК костного мозга [27]. Клетки preconditionировали, помещая их на 4 ч в среду без кислорода с последующей 2-часовой реоксигенацией. По данным авторов, подобное воздействие не вызывало появления необратимых повреждений, что говорит о высокой толерантности СК к гипоксии. Немедленно после коронароокклюзии в миокард ЛЖ мышей вводили preconditionированные и обычные СК. После ГП количество фосфорилированной Akt-киназы в СК увеличивалось в 2 раза. Эта киназа, как известно, повышает выживаемость клеток в неблагоприятных условиях, а фосфорилирование свидетельствует об активации этого фермента [52]. Трансплантация СК уменьшала апоптоз кардиомиоцитов, наибольший антиапоптозный эффект оказывали preconditionированные СК. Поскольку стволовые клетки оказывают антиапоптозный эффект *in vitro* и при совместной инкубации СК и клеток миокарда, авторы предположили, что цитопротекторный эффект СК осуществляется за счет секреции стволовыми клетками паракринных факторов [27]. Через месяц после трансплантации в инфарктированный миокард preconditionированных СК у мышей отмечался наименьший объем левого желудочка и наибольшая ФВ ЛЖ. Эти результаты позволили авторам заключить, что пересадка СК препятствует ремоделированию ЛЖ, а ГП усиливает протекторный эффект СК [27].

Кардиологи из Китая [53] воспроизводили ГП, помещая МСК на 10, 20 или 30 минут в газовую среду, содержащую 8% O<sub>2</sub>, с последующей реоксигенацией перед моделированием длительной гипоксии (6 ч, 5% O<sub>2</sub>) и реоксигенацией (12 ч). При оценке выживаемости МСК и количества апоптозных (TUNEL-позитивных) клеток оказалось, что все три типа ГП в равной мере повышали выживаемость МСК, а наиболее выраженный антиапоптозный эффект оказывала гипоксия продолжительностью 30 минут. Усиливается экспрессия антиапоптозного белка Bcl-2 (B-cell lymphoma protein-2) и VEGF, последний стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов. Антиапоптозный белок Bcl-2 является ингибитором MPT-поры (mitochondrial permeability transition pore) — надмолекулярный комплекс, состоящий из нескольких белков, интегрированных на внешней

и внутренней мембране митохондрий [54]. Открытие этих пор ведет к разобщению окислительного фосфорилирования и выходу из митохондрий цитохрома C и белка AIF (apoptosis-inducing factor), которые катализируют превращение неактивной прокаспазы-9 в активную каспазу-9. Последняя катализирует превращение прокаспазы-3 в каспазу-3, что в конечном итоге ведет к апоптозу [54]. Очевидно, что способность белка Bcl-2 препятствовать открытию MPT-поры объясняет тот факт, что в preconditionированных МСК сохраняется высокий потенциал на внутренней мембране митохондрий ( $\Delta\psi$ ), и снижается интенсивность апоптоза [53]. Кроме того, авторы обнаружили, что ГП вызывает фосфорилирование киназ ERK (extracellular regulated kinase) и Akt [53]. Эти киназы обеспечивают выживание клеток в неблагоприятных условиях, а фосфорилирование является показателем их активации [52]. Одновременно было отмечено увеличение экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) [53], который усиливает синтез белков, повышающих устойчивость клеток к гипоксии [55]. Сходные результаты получила I. Rosova и соавт. [44], которые инкубировали МСК в среде с содержанием O<sub>2</sub> равным 1–3% в течение 24 ч, что расценивалось авторами как ГП. Preconditionирование увеличивало количество фосфорилированной антиапоптозной Akt-киназы и усиливало миграцию МСК [44]. Кроме того, было обнаружено увеличение экспрессии рецептора фактора роста HGF (hepatocyte growth factor), усиливавшего фосфорилирование Akt-киназы в МСК [44]. Увеличение секреции HGF мезенхимальными СК после ГП отмечали исследователи из Тайваня [56]. Таким образом, ГП перестраивает фенотип клетки так, что она становится устойчивой к действию длительной гипоксии.

В 2008 г. X. Hu и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов с МСК, которые инкубировали в условиях гипоксии (0,5% O<sub>2</sub> в течение 24 ч) [57]. Подобное воздействие они назвали гипоксическим preconditionированием. Затем нормоксические и гипоксические МСК вводили в перинфарктную зону через 30 мин после коронароокклюзии у крыс. Реперфузию не осуществляли. Через 6 месяцев определяли ангиогенез, размер инфаркта, насосную функцию сердца. Факт определения размера инфаркта представляется сомнительным, потому что уже через 1,5 месяцев после экспериментальной коронароокклюзии у крыс завершается формирование постинфарктного рубца [58]. В данном случае правильное говорить о размере рубца. Гипоксическое preconditionирование вызывало усиление экспрессии HIF- $\alpha$ , а также ангиопоэтина-1, участвующего в ангиогенезе. Одновременно увеличивалась экспрессия рецепторов эритропоэтина и продукция эритропоэтина, который, как известно, не только стимулирует гемопоэз, но и повышает устойчивость клеток к действию гипоксии-реоксигенации [59]. Усиливается и экспрессия белков Bcl-2 и Bcl-xL [57], ингибирующих открытие MPT-поры [54]. МСК начинают экспрессировать антиген KDR, характерный для эндотелиоцитов, то есть превращаются в клетки-предшественники эндотелиоцитов. По данным авторов, трансплантация нормоксических и гипоксических МСК усиливает ангиогенез в зоне ишемии, наиболее выраженный ангиогенный эффект оказывают preconditionированные МСК [57]. Трансплантация МСК способствовала уменьшению размеров инфаркта, увеличению систолического давления в ЛЖ, уменьшению диастолического давления в ЛЖ; отмечалось увеличение скорости сокращения и расслабления сердца [57]. Наиболее выраженный протекторный эффект оказывали preconditionированные МСК.



В данной работе крысам пересаживали МСК, полученные из костного мозга мышей, при этом иммуносупрессия не проводилась. В этих условиях выживание трансплантированных клеток вызывает большие сомнения. Видимо, позитивный эффект трансплантации был связан с продукцией МСК паракринных факторов в первые дни после трансплантации. В 2009 г. тот же коллектив авторов опубликовал результаты дальнейших исследований, посвященных кардиопротекторному эффекту МСК [60]. Мезенхимальные СК вводили в периинфарктную зону (3–5 инъекций) через неделю после коронарной окклюзии. Через 4 недели после трансплантации МСК проводили эхокардиографию и морфометрию. Часть МСК подвергали 10-минутной аноксии и последующей реоксигенации (30 минут). Оказалось, что трансплантация МСК способствует увеличению ФВ ЛЖ и уменьшает дилатацию последнего. Наиболее выраженный инотропный эффект оказывало применение preconditionированных МСК. Они же обеспечивали неоангиогенез в зоне инфаркта [60]. Следовательно, ГП не только увеличивает устойчивость СК к гипоксии, но и повышает эффективность клеточной терапии инфаркта миокарда.

По мнению Y.L. Tang и соавт., низкая эффективность клеточной терапии инфаркта миокарда связана с тем, что СК не задерживаются в зоне инфаркта миокарда [48]. Хоминг СК в зоне ишемии зависит от уровня в ишемизированной ткани хемокина SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) и экспрессии стволовыми клетками рецептора хемокина SDF-1 (CXCR4) [61]. В 2010 г. Н. Liu и соавт. опубликовали работу, в которой оценивали эффект гипоксии (3% O<sub>2</sub>) различной продолжительности на экспрессию мезенхимальными стволовыми клетками рецепторов SDF-1 (CXCR4 и CXCR7) [62]. Наибольшее влияние оказывала гипоксия продолжительностью 24 ч, когда экспрессия CXCR4 и CXCR7 увеличивалась примерно в 10 раз [62]. Усиливалась устойчивость МСК к окислительному стрессу, вызванному внесением в среду инкубации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Preconditionирование вызывало увеличение в МСК количества HIF-1α, общей и фосфорилированной Akt-киназы. Авторы полагают, что последняя играет ключевую роль в ГП. Действительно внесение в среду инкубации МСК ингибиторов PI3-киназы (вортманнин или LY294002), которая активирует Akt, устраняет усиление экспрессии самой Akt-киназы, HIF-1α, CXCR4 и CXCR7. Эти данные были подтверждены в более поздней работе L. Wei и соавт., которая была выполнена на МСК, выделенных из костного мозга крыс [63]. Preconditionировали МСК, помещая клетки в атмосферу, содержащую 0,5% O<sub>2</sub> (продолжительность инкубации в статье L. Wei и соавт. не указана). Гипоксическое preconditionирование усиливало экспрессию HIF-1α, VEGF, его рецептора (Flk-1) и CXCR4 [63]. В работе Н. Liu и соавт. были получены сходные данные. Они показали, что ГП усиливает экспрессию мезенхимальными стволовыми клетками CXCR4 и CXCR7 [64]. Похожие данные получили независимые коллективы из Китая и Тайваня [56, 65].

Видимо, события в МСК развиваются следующим образом: ГП → Akt-киназа → HIF-1α → усиление выживаемости МСК в неблагоприятных условиях; ГП → Akt-киназа → CXCR4 и CXCR7 → усиление хоминга МСК в зоне ишемии; или ГП → HIF-1α → VEGF, Flk-1, CXCR4 → усиление хоминга МСК и неоангиогенеза в зоне ишемии.

В 2009 г. Н. W. Kim и соавт. изучали эффект ГП на некроз и апоптоз МСК, выделенных из костного мозга, в условиях 6-часовой глубокой гипоксии (аноксии) [66]. Некроз оценивали по уровню лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

в среде инкубации, а апоптоз — по количеству TUNEL-позитивных клеток. Использовали несколько протоколов ГП. Продолжительность реоксигенации во всех протоколах составляла 10 минут. Длительность аноксии — 10 или 30 минут. Количество циклов колебалось от одного до трех. Наибольшего защитного эффекта удалось добиться при использовании двух циклов аноксии (30 минут) и реоксигенации (10 минут). При использовании подобного preconditionирования уровень ЛДГ при последующей длительной гипоксии снижался в 1,5 раза, а количество TUNEL-позитивных клеток уменьшалось почти в 4 раза [66]. Одновременно было отмечено 6-кратное снижение количества каспазы-8, которая играет важную роль в патогенезе апоптоза. После ГП (без длительной аноксии) в 12 раз усиливалась экспрессия HIF-1α, существенно возрастало количество фосфорилированных киназ, обеспечивающих выживаемость клетки в неблагоприятных условиях (ERK1/2 и Akt), клетки начинали экспрессировать антиапоптозный белок Bcl-xl. В опытах *in vivo* крысам немедленно после коронарной окклюзии в периинфарктную зону инъецировали среду инкубации, содержащую МСК. Через 4 суток оценивали выживаемость пересаженных МСК в миокарде крыс. Оказалось, что выживаемость preconditionированных МСК *in situ* возрастает в 1,5 раза по сравнению с обычными МСК [66]. Эти данные были подтверждены в более поздней статье тех же авторов, выполненной на МСК, выделенных из костного мозга крыс [67]. Клетки preconditionировали с помощью 2 циклов аноксии (30 минут) и реоксигенации (10 минут). Затем МСК использовали для экспериментов *in vivo* или для трансплантации в инфарктированный миокард. Стволовые клетки вводили с помощью нескольких микроинъекций в периинфарктную зону сразу же после коронароокклюзии. Через 4 недели инфаркт (рубец) был в 2 раза меньше, а ФВ ЛЖ была в 1,5 раза больше после трансплантации preconditionированных МСК, чем после пересадки обычных клеток [67]. Таким образом, авторам удалось подтвердить, что ГП увеличивает выживаемость МСК в неблагоприятных условиях как *in vitro*, так и *in vivo*, и препятствует постинфарктному ремоделированию сердца.

Исследователи из США провели сравнительный анализ эффективности различных протоколов ГП в отношении маркеров выживаемости МСК, проангиогенных факторов и других маркеров [68]. Клетки инкубировали в атмосфере 0,5% O<sub>2</sub> в течение 24, 48 и 72 ч. Preconditionирование индуцировало увеличение экспрессии HIF-1α. Эффект достигал максимума при инкубации в условиях гипоксии в течение 48 ч. Отмечено было усиление экспрессии VEGF и HGF-рецептора, а количество CXCR4 не претерпевало существенных изменений. После ГП появились маркеры дифференцировки МСК в кардиомиоциты (коннексин-43) и клетки эндотелия (CD31) [68]. В целом данные американских физиологов совпадают с вышеприведенными результатами исследований других авторов.

В 2011 г. К. М. Peterson и соавт. опубликовали сведения, которые касаются механизма протекторного действия ГП [69]. Гипоксическое preconditionирование МСК моделировали с помощью 2 циклов гипоксии (10 минут, 1% O<sub>2</sub>) и реоксигенации (30 минут, 21% O<sub>2</sub>). Повреждение МСК вызывали с помощью воздействия длительной гипоксии (24 ч, 1% O<sub>2</sub>) [69]. Некротическую гибель МСК оценивали по уровню ЛДГ в среде инкубации, а программируемую гибель клеток — по количеству меченого аннексина-V, связанного с клеточными мембранами МСК. Известно,

что белок аннексин-V избирательно связывается фосфатидилсерин [70]. Этот фосфолипид в норме отсутствует во внешнем слое мембраны и появляется только в случае включения программы клеточной гибели, поэтому аннексин-V является высокоспецифичным маркером апоптоза [70]. Воздействие длительной гипоксии (24 ч, 1%  $O_2$ ) приводило к повышению концентрации ЛДГ в среде инкубации и увеличению связывания аннексина-V с клеточными мембранами. Гипоксическое preconditionирование снижало уровень ЛДГ и блокировало связывание аннексина-V после продолжительной гипоксии [69]. Следовательно, ГП ингибирует некроз и апоптоз МСК после длительной гипоксии. Длительное «кислородное голодание» увеличивало продукцию активных форм кислорода (АФК) в 4 раза, а синтез  $H_2O_2$  повышался в 2 раза. Preconditionирование полностью устраняло эти негативные проявления гипоксии [69]. Продолжительное «кислородное голодание» снижало экспрессию стволовыми клетками белка сурвивина [69], который, как известно, является ингибитором каспаз и подавляет процесс апоптоза [71]. Гипоксия вызывала увеличение экспрессии НАДФН-оксидазы, которая синтезирует супероксидный анион-радикал [72]. Preconditionирование устраняло этот негативный эффект гипоксии и усиливало экспрессию супероксиддисмутазы. Вместе с тем длительная гипоксия оказывала некоторые эффекты, которые можно расценить как положительные: увеличивалось количество фосфорилированной Akt-киназы, повышался уровень антиапоптозного белка Bcl-2, увеличивалась экспрессия PI3-киназы [69], которая обеспечивает выживаемость клеток в неблагоприятных условиях [52]. Следовательно, длительная гипоксия может вести не только к ГП, но и повреждению СК.

Несмотря на вышеперечисленные негативные эффекты, длительную гипоксию продолжают использовать в качестве адаптирующего воздействия. Так сотрудники МГУ провели исследование продукции МСК ростовых факторов, участвующих в ангиогенезе (VEGF, HGF, PlGF — placental growth factor) [73]. Оказалось, что продукция этих факторов снижается в МСК, выделенных из жировой ткани старых крыс (18–24 месяцев), а воздействие длительной гипоксии (48 ч, 1%  $O_2$ ) восстанавливало продукцию ростовых факторов для значений, характерных для МСК молодых животных. Данный факт важен, если говорить о возможности практического применения аутологических СК у пожилых пациентов с инфарктом миокарда. Усиление продукции VEGF жировыми МСК после воздействия ГП отмечали и другие исследователи [74].

В настоящее время исследователи пытаются не только описать основные проявления ГП стволовых клеток, но и выяснить его механизм. Китайские физиологи исследовали механизм увеличения подвижности МСК после воздействия ГП [45]. Мезенхимальные стволовые клетки выделяли из костного мозга мышей. Гипоксическое preconditionирование моделировали, помещая МСК в камеру при концентрации  $O_2$  0,5% в течение 24 ч. Preconditionирование усиливало миграцию МСК *in vitro* и хоминг стволовых клеток инфарктированным миокардом *in vivo*. Авторы предположили, что усиление подвижности МСК может быть следствием усиления экспрессии потенциалзависимых  $K^+$ -каналов (Kv2.1, Kv1.5 и Kv1.4), участвующих в регуляции подвижности клеток. Оказалось, что ГП вызывает увеличение экспрессии Kv2.1 приблизительно в 15 раз [45]. ГП-индуцированного повышения миграции МСК не удалось выявить у мышей, нокаутированных по гену, кодирующему Kv2.1. Такой

же эффект оказывал блокатор потенциалзависимых  $K^+$ -каналов тетраэтиламмоний. Кроме того, авторы оценивали роль FAK (focal adhesion kinase) в регуляции подвижности МСК. Preconditionирование увеличивало экспрессию FAK в 2,5 раза, а если в среду инкубации клеток добавляли тетраэтиламмоний, то активации синтеза FAK не наблюдалось. С помощью иммуопреципитации авторы показали, что в МСК образуется комплекс Kv2.1-FAK, который обеспечивает повышенную миграцию адаптированных МСК [45]. Другая группа исследователей установила, что ГП (1%  $O_2$ , 24 ч) мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из костного мозга, приводит к усилению анаэробного гликолиза [75]. Одновременно увеличивается количество мРНК HIF-1 $\alpha$  и Glut-1 (переносчик глюкозы). Добавление в среду инкубации siRNA (small interfering RNA), комплементарной к мРНК HIF-1 $\alpha$ , приводило к устранению названных эффектов ГП. Известно, что siRNA могут избирательно блокировать трансляцию определенных мРНК и ускорять расщепление мРНК, поэтому представленные данные подкрепляют точку зрения о важной роли HIF-1 $\alpha$  в механизме ГП [76].

Позитивный эффект ГП отмечается и в отношении клеток человека. В 2010 г. L.L. Ong и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов с CD133 $^+$ -клетками, выделенными из костного мозга человека [77]. Гликопротеин CD133 $^+$  экспрессируется гемопоэтическими стволовыми клетками [78], клетками-предшественниками эндотелиоцитов [79], клетками глиобластомы, нейрональными и глиальными СК [80]. Клетки CD133 $^+$  на 24 ч помещали в инкубационную камеру при концентрации  $O_2$  равной 1,5%, а затем инкубировали 48 ч в нормоксических условиях (21%  $O_2$ ). Авторы показали, что ГП усиливает дифференцировку CD133 $^+$ -клеток в эндотелиоциты [77]. Выше речь шла главным образом об исследованиях, выполненных на СК, выделенных из костного мозга. В 2010 г. корейские физиологи опубликовали результаты своих исследований, выполненных на МСК, изолированных из жировой ткани человека [81]. Для моделирования гипоксического preconditionирования МСК на 24 ч помещали в камеру с пониженным содержанием кислорода (1%  $O_2$ ), реоксигенацию осуществляли в течение суток. Подобное preconditionирование увеличивало выживаемость клеток в условиях окислительного стресса, индуцированного внесением в среду инкубации  $H_2O_2$  [77]. В 2013 г. S. De Barros и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов с МСК, выделенными из жировой ткани молодых и старых доноров. Оказалось, что старение снижало способность МСК дифференцироваться в эндотелиальные клетки, уменьшалась продукция VEGF [82]. Гипоксическое preconditionирование (0,5%  $O_2$  в течение 24 ч) увеличивало синтез VEGF и усиливало способность МСК дифференцироваться в эндотелиоциты.

В 2012 г. S.L. Stubbs и соавт. [83] опубликовали результаты своих экспериментов с изолированными из жировой ткани человека МСК. Гипоксическое preconditionирование воспроизводили, помещая МСК в гипоксическую среду (концентрация кислорода в статье Stubbs и соавт. не указана) на 24 ч с последующей реоксигенацией (24 ч). Ишемию имитировали, помещая клетки в камеру при концентрации кислорода 0,1%, в среду без глюкозы и сыворотки крови на 24 ч. Подобное жесткое воздействие приводило к некрозу и апоптозу МСК. Preconditionирование нивелировало эти негативные проявления «ишемии». Гипоксическое preconditionирование способствовало увеличению уровня HIF-1 $\alpha$  в несколько

раз по сравнению с нормоксическим контролем [83]. Одновременно в несколько раз увеличивалась секреция VEGF. Антитела к VEGF полностью устраняли цитопротекторный эффект ГП, так же действовал ингибитор PI3-киназы LY294002. После ГП было зафиксировано увеличение количества фосфорилированной Akt-киназы [83]. По мнению авторов, события в клетке развиваются следующим образом: ГП → HIF-1α → VEGF → PI3-киназа → Akt-киназа → усиление толерантности к гипоксии.

В 2013 г. J. Jaussaud и соавт. получили интересные данные, касающиеся ГП мезенхимальных СК, выделенных из костного мозга человека [84]. Гипоксическое прекондиционирование осуществляли, помещая МСК на 7 дней в атмосферу с содержанием кислорода 1,5%. В отличие от других авторов, J. Jaussaud и соавт. моделировали у свиней не инфаркт, а ишемию сердца, то есть состояние, сходное с ишемической кардиомиопатией [84]. Вокруг огибающей артерии (*r. circumflexus*) помещали окклюдер, который обеспечивал сужение просвета артерии на 90%. Через месяц после частичной окклюзии в ишемизированный миокард пересаживали МСК, а еще через месяц оценивали состояние сердца. Трансплантация прекондиционированных МСК обеспечивала увеличение ФВ ЛЖ, способствовала снижению конечного диастолического объема ЛЖ, снижала центральное венозное давление. Пересадка обычных МСК подобного эффекта не оказывала [84]. Представленные данные свидетельствуют о перспективности использования прекондиционированных МСК человека для лечения ишемической кардиомиопатии.

Выше речь шла о стволовых клетках, однако в регенерации миокарда, возможно, большую роль играют сердечные клетки-предшественники (СКП), которые могут дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиоциты и гладкомышечные клетки [85–89]. Первоначально их называли кардиальными стволовыми клетками [85–87], но затем стали использовать термин «сердечные клетки-предшественники» (*cardiac progenitor cells*) [48, 88, 89]. Физиологи из США выделяли СКП из миокарда 2-месячных мышей, а после культивирования в течение 50 дней СКП пересаживали в миокард мышей с экспериментальным инфарктом [48]. Часть СКП подвергали воздействию 6-часовой гипоксии, что авторы называли ГП. Подобное прекондиционирование вызывало усиление экспрессии HIF-1α и CXCR4. Прекондиционированные и обычные СКП пересаживали в инфарктированный миокард мышей и эхокардиографически оценивали сократимость миокарда. Через месяц после трансплантации было отмечено увеличение ФВ ЛЖ у мышей, которым пересадили прекондиционированные СКП. У особей, которым пересадили обычные СКП, улучшения насосной функции сердца не наблюдалось [48]. Если ГП клеток-предшественников осуществлялось в присутствии антагониста CXCR4 препарата AMD, то при последующей трансплантации СКП улучшения сократимости сердца не отмечалось. Морфометрические исследования, выполненные через месяц после инфаркта, показали, что пересадка прекондиционированных СКП препятствовала гипертрофии сердца, обеспечивала уменьшение размера инфаркта (рубца), способствовала утолщению стенки ЛЖ в области ишемии [48]. В 2012 г. F. Yan и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов с СКП, выделенными из миокарда взрослых мышей [89]. Прекондиционирование воспроизводили, помещая СКП в атмосферу, содержащую 0,1% O<sub>2</sub>, на 3, 6, 12 и 24 ч. Авторами было установлено, что пребы-

вание клеток в условиях гипоксии в течение 24 ч вызывает апоптоз СКП. При нахождении в условиях «кислородного голодания» на протяжении более коротких промежутков времени усиления апоптоза выявить не удалось, поэтому в дальнейших экспериментах прекондиционированные в течение 24 ч клетки не использовались. Прекондиционирование увеличивало секрецию клетками VEGF и SDF-1α [89]. Подобный эффект ГП отмечали и другие исследователи [27]. После ГП было зафиксировано усиление экспрессии HIF-1α и CXCR4, увеличился уровень фосфорилированной Akt-киназы и фосфорилированного Bcl-2. Апоптоз СКП индуцировали, помещая клетки на 6 ч в условия гипоксии и удаляя из среды инкубации сыворотку крови. Оказалось, что 6-часовое ГП достоверно снижает интенсивность апоптоза СКП в этих условиях. В экспериментах *in vivo* на мышах СКП вводили в перинфарктную зону, эффект трансплантации СКП оценивали через 7 суток после инфаркта миокарда. Выяснилось, что трансплантация нормоксических и прекондиционированных СКП оказывает инфарктулимитирующий эффект и увеличивает ФВ ЛЖ. Однако пересадка прекондиционированных СКП оказывала достоверно более выраженный кардиопротекторный эффект по сравнению с обычными СКП. Только гипоксические СКП предотвращали постинфарктную гипертрофию сердца. Антагонист CXCR4 препарат AMD3100 ослаблял защитный эффект трансплантации прекондиционированных СКП, но не устранял его полностью [89]. Таким образом, ГП усиливало эффективность клеточной терапии инфаркта миокарда за счет усиления экспрессии CXCR4 и увеличения продукции факторов, стимулирующих неопангиогенез и предупреждающих апоптоз клеток в условиях гипоксии.

В 2012 г. были опубликованы результаты первой фазы клинических исследований по применению СКП для лечения больных, перенесших ИМ (исследование CADUCEUS) [90]. Это исследование проводилось в США под руководством проф. E. Marban (Cedars-Sinai Heart Institute, Лос-Анджелес). В исследование были включены пациенты в период 2–4 недель после ИМ. Резидентные сердечные клетки-предшественники получали путем биопсии сердца этих пациентов. После размножения СКП в лабораторных условиях полученные скопления СКП, называемые кардиосферами, трансплантировали в реканализированную коронарную артерию того же пациента, у которого эти клетки были собраны. В течение 6 месяцев наблюдения не было отмечено никаких осложнений после инфузии кардиосфер в сердце больных, перенесших ИМ. Отторжения трансплантированных СКП, а также формирования злокачественных опухолей не происходило. Магнитно-резонансная томография показала уменьшение зоны инфаркта и улучшение сократимости левого желудочка. Так была показана безопасность применения СКП в клинике, что создает определенный потенциал для проведения следующей фазы клинических исследований СКП. Другое клиническое исследование по применению резидентных СКП человека для лечения ИМ (исследование SCIPRO) также показало безопасность трансплантации аутологичных СКП [91]. Один миллион СКП было трансплантировано путем инфузии через коронарную артерию больным через 113 дней после проведения операции аортокоронарного шунтирования. Так же как и в клиническом исследовании CADUCEUS, никаких побочных явлений или отторжения СКП не наблюдалось. Через год после пересадки СКП у пациентов наблюдалось уменьшение зоны инфаркта и увеличение ФВ ЛЖ. Недавние исследования, проведенные на СКП, выделенных из сердца мышей, показали, что ГП в течение



6 ч улучшает выживаемость и хоминг этих клеток после трансплантации в ишемизированный миокард мышей [89]. Положительные результаты, полученные на мышинных СКП, позволяют предположить, что ГП может стать обязательной процедурой в подготовке аутологических СКП человека для выживания после пересадки в сердце инфарктных больных.

### Заключение

За последние 20 лет число публикаций по исследованию терапии инфаркта миокарда с помощью стволовых клеток увеличилось в геометрической прогрессии. Различные типы СК применялись с большим или меньшим успехом. Существенными препятствиями к формированию нового миокарда из пересаженных стволовых клеток являются следующие: 1) далеко не каждый тип стволовых клеток может дифференцироваться в кардиомиоциты; 2) показана низкая выживаемость трансплантированных клеток в инфарктной ткани сердца. Гипоксическое preconditionирование существенно повышает эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и сердечных клеток-предшественников при терапии экспериментального инфаркта миокарда и экспериментальной ишемической кардиомиопатии. Трансплантация preconditionированных СК

оказывает инфарктомитирующий эффект, препятствует постинфарктному ремоделированию сердца, оказывает позитивный эффект на течение экспериментальной ишемической кардиомиопатии. Гипоксическое preconditionирование предупреждает некроз и апоптоз стволовых клеток в условиях тяжелой длительной гипоксии или окислительного стресса. Защитный эффект ГП связывают с тремя основными процессами: 1) формированием фенотипа клетки, обеспечивающего выживаемость в условиях гипоксии (усиление экспрессии HIF-1 $\alpha$ , активация ERK1/2-киназы, Akt-киназы, усиление экспрессии рецепторов эритропоэтина и продукции эритропоэтина, повышение уровня в клетке антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL); 2) увеличением продукции факторов роста (VEGF, HGF) и рецептора Flk-1; 3) усилением экспрессии рецепторов CXCR4 и CXCR7, которые обеспечивают хоминг стволовых клеток в зоне ишемии. Положительный эффект трансплантации СК, наблюдаемый в эксперименте, по-видимому, является результатом усиления продукции факторов роста, которые стимулируют пролиферацию собственных СКП реципиента. Для решения вопроса о перспективах клинического применения ГП стволовых клеток необходимы эксперименты по preconditionированию аутологических клеток.

Авторы выражают признательность  
за техническую помощь Н.А. Данильченко.

23

### REFERENCES

- Markov V.A., Ryabov V.V., Maksimov I.V. et al. *Sib. med. zhur – Siberian oncological journal*. 2011; 26(2), issue1: 8–14.
- Suleiman M., Aronson D., Reisner S.A. et al. Admission C-reactive protein levels and 30-day mortality in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Med.* 2003; 115 (9): 695–701.
- Solomon S.D., St John Sutton M., Lamas G. et al. Survival And Ventricular Enlargement (SAVE) Investigators. Ventricular remodeling does not accompany the development of heart failure in diabetic patients after myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106 (10): 1251–1255.
- Richards A.M., Nicholls M.G., Troughton R.W. et al. Antecedent hypertension and heart failure after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39 (7): 1182–1188.
- Parodi G., Carrabba N., Santoro G.M. et al. Heart failure and left ventricular remodeling after reperfused acute myocardial infarction in patients with hypertension. *Hypertension*. 2006; 47 (4): 706–710.
- Araszkievicz A., Lesiak M., Grajek S. et al. Relationship between tissue reperfusion and postinfarction left ventricular remodeling in patients with anterior wall myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty. *Kardiol. Pol.* 2006; 64 (4): 383–388.
- Soonpaa M.H., Field L.J. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am. J. Physiol.* 1997; 272 (1 Pt. 2): H220–H226.
- Quaini F., Cigola E., Lagrasta C. et al. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1994; 75 (6): 1050–1063.
- Reiss K., Kajstura J., Zhang X., Li P. et al. Acute myocardial infarction leads to upregulation of the IGF-1 autocrine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes. *Exp. Cell. Res.* 1994; 213 (2): 463–472.
- Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J. et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344 (23): 1750–1757.
- Hsieh P.C., Segers V.F., Davis M.E. et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature Med.* 2007; 13 (8): 970–974.
- Neckar J., Ostadal B., Kolar F. Acute but not chronic temp treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. *Physiol. Res.* 2008; 57 (4): 653–656.
- Marelli D., Desrosiers C., el-Alfy M. et al. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant.* 1992; 1 (6): 383–390.
- Chiu R.C., Zibaitis A., Kao R.L. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann. Thorac. Surg* 1995; 60 (1): 12–18.
- Koh G.Y., Klug M.G., Soonpaa M.H., Field L.J. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J. Clin. Invest.* 1993; 92 (3): 1548–1554.
- Grounds M.D., White J.D., Rosenthal N., Bogoyevitch M.A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50 (5): 589–610.
- Hughes S. Cardiac stem cells. *J. Physiology*. 2002; 197 (4): 468–478.
- Orlic D., Hill J.M., Arai A.E. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ. Res.* 2002; 91 (12): 1092–1102.
- Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002; 105 (1): 93–98.
- Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H. et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004; 428 (6983): 664–668.
- Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L. et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428 (6983): 668–673.
- Limbourg F.P., Ringes-Lichtenberg S., Schaefer A. et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment. *Eur. J. Heart Fail.* 2005; 7 (5): 722–729.
- Bianco P., Cao X., Frenette P.S. et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* 2013; 19 (1): 35–42.



24. Yoshioka T., Ageyama N., Shibata H. et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 2005; 23 (3): 355–364.
25. Mirosou M., Zhang Z., Deb A. et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104 (5): 1643–1648.
26. Fazel S., Cimini M., Chen L., Li S. et al. Cardioprotective c-kit<sup>+</sup> cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J. Clin. Invest.* 2006; 116 (7): 1865–1877.
27. Uemura R., Xu M., Ahmad N., Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ. Res.* 2006; 98 (11): 1414–1421.
28. Abkowitz J.L., Catlin S.N., McCallie M.T., Guttorp P. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*. 2002; 100 (7): 2665–2667.
29. Hatzistergos K.E., Quevedo H., Oskouei B.N. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ. Res.* 2010; 107(7): 913–922.
30. Bittner R.E., Schofer C., Weipoltshammer K. et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.* 1999; 199 (5): 391–396.
31. Quaini F., Urbanek K., Beltrami A.P. et al. Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346 (1): 5–15.
32. Hruban R.H., Long P.P., Perlman E.J. et al. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am. J. Pathol.* 1993; 142 (4): 975–980.
33. Strauer B.E., Brehm M., Zeus T. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002; 106 (15): 1913–1918.
34. Strauer B.E., Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*. 2003; 107 (7): 929–934.
35. Assmus B., Schachinger V., Teupe C. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002; 106 (24): 3009–3017.
36. Ryabov V.V., Suslova T.E., Krylov A.L. etc. *Ter. arkhiv - Therapeutic Archive*. 2006; 78(8): 47–52.
37. Vesnina Zh.V., Sazonova S.I., Krylov A.L. etc. *Vestnik NGU - Bulletin of NSU*. 2011; 9(1): 71–76.
38. Ryabov V.V., Krylov A.L., Poponina Yu.S., Maslov L.N. *Kletoch. tekhnol. v biol. i med - Molecular technologies in biology and medicine*. 2006; 1: 15–20.
39. Krylov A.L., Ryabov V.V., Poponina Yu.S., Maslov L.N. *Klin. med - Clinical medicine*. 2006; 84(9): 31–35.
40. Britten M.B., Abolmaali N.D., Assmus B. et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003; 108 (18): 2212–2218.
41. Dobert N., Britten M., Assmus B. et al. Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium SPECT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2004; 31 (8): 1146–1151.
42. Das R., Jahr H., van Osch G.J., Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010; 16 (2): 159–168.
43. Herrmann J.L., Abarbanell A.M., Weil B.R. et al. Optimizing stem cell function for the treatment of ischemic heart disease. *J. Surg. Res.* 2011; 166 (1): 138–145.
44. Rosova I., Dao M., Capoccia B. et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (8): 2173–2182.
45. Hu X., Wei L., Taylor T.M. et al. Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via Kv2.1 channel and FAK activation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2011; 301 (2): C362–C372.
46. Kofoed H., Sjøtoft E., Siemssen S.O., Olesen H.P. Bone marrow circulation after osteotomy. Blood flow, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pressure studied in dogs. *Acta Orthop. Scand.* 1985; 56 (5): 400–403.
47. Tsai C.C., Yew T.L., Yang D.C. et al. Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. *Am. J. Blood Res.* 2012; 2 (3): 148–159.
48. Tang Y.L., Zhu W., Cheng M. et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ. Res.* 2009; 104 (10): 1209–1216.
49. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Kolar F. etc. *Ross. fiziol. zhur - Russian physiological journal*. 2010; 96(12): 1170–1189.
50. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Emel'yanova T.V. etc. *Angiol. sosud. khirurgiya - Angiology and vascular surgery*. 2011; 17(3): 27–36.
51. Akita T., Murohara T., Ikeda H. et al. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab. Invest.* 2003; 83 (1): 65–73.
52. Maslov L.N., Mrochek A.G., Shchepetkin I.A. etc. *Ross. fiziol. zhur - Russian physiological journal*. 2013; 99(4): 433–452.
53. Wang J.A., Chen T.L., Jiang J. et al. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008; 29 (1): 74–82.
54. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 2007; 87 (1): 99–163.
55. Naryzhnaya N.V., Lishmanov Yu.B., Kolar F. etc. *Ross. fiziol. zhur - Russian physiological journal*. 2011; 97(9): 35–50.
56. Chang C.P., Chio C.C., Cheong C.U. et al. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clin. Sci. (Lond)*. 2013; 124 (3): 165–176.
57. Hu X., Yu S.P., Fraser J.L. et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008; 135 (4): 799–808.
58. Lishmanov Yu.B., Maslov L.N., Ugdyzhkova D.S., Smagin G.N. Participation of central kappa-opioid receptors in arrhythmogenesis. *Life Sci.* 1997; 61 (3): PL33–PL38.
59. Maslov L.N. The role of erythropoietin in ischemic preconditioning, postconditioning, and regeneration of the brain after ischemia. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2011; 41 (4): 353–363.
60. Wang J.A., He A., Hu X. et al. Anoxic preconditioning: a way to enhance the cardioprotection of mesenchymal stem cells. *Int. J. Cardiol.* 2009; 133 (3): 410–412.
61. Wang Y., Luther K. Genetically manipulated progenitor/stem cells restore function to the infarcted heart via the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signaling pathway. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012; 111: 265–284.
62. Liu H., Xue W., Ge G. et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 $\alpha$  in MSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 401 (4): 509–515.
63. Wei L., Fraser J.L., Lu Z.Y., Hu X., Yu S.P. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol. Dis.* 2012; 46 (3): 635–645.
64. Liu H., Liu S., Li Y. et al. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in the therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2012; 7 (4): e34608.
65. Liu H., Yu X.F., Teng J. et al. Effects of hypoxic preconditioning on the migration of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2012; 92 (10): 709–713.
66. Kim H.W., Haider H.K., Jiang S., Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression

- by targeting caspase-8-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (48): 33161–33168.
67. Kim H.W., Mallick F., Durrani S. et al. Concomitant activation of miR-107/PDCD10 and Hypoxamir-210/Casp8ap2 and their role in cytoprotection during ischemic preconditioning of stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2012; 17 (8): 1053–1065.
  68. Chacko S.M., Ahmed S., Selvendiran K. et al. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010; 299 (6): C1562–C1570.
  69. Peterson K.M., Aly A., Lerman A. et al. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci.* 2011; 88 (1–2): 65–73.
  70. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84 (5): 1415–1420.
  71. Sah N.K., Khan Z., Khan G.J., Bisen P.S. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* 2006; 244 (2): 164–171.
  72. Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. etc. *Okislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty* [Oxidative Stress. Prooxidants and Antioxidants]. Moscow, Firma «Slovo», 2006. 556 p.
  73. Efimenko A., Starostina E., Kalinina N., Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 10.
  74. Hollenbeck S.T., Senghaas A., Komatsu I. et al. Tissue engraftment of hypoxic-preconditioned adipose-derived stem cells improves flap viability. *Wound Repair Regen.* 2012; 20(6): 872–878.
  75. Zhu H., Chen X., Deng L. Effects of hypoxic preconditioning on glucose metabolism of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2011; 25(8): 1004–1007.
  76. Sen G.L., Wehrman T.S., Blau H.M. mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage. *Differentiation.* 2005; 73(6): 287–293.
  77. Ong L.L., Li W., Oldigs J.K. et al. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133<sup>+</sup> cells. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2010; 16 (5): 1069–1081.
  78. Horn P.A., Tesch H., Staib P. et al. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 1999; 93 (4): 1435–1437.
  79. Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000; 95 (3): 952–958.
  80. Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353 (8): 811–822.
  81. Oh J.S., Ha Y., An S.S. et al. Hypoxia-preconditioned adipose tissue-derived mesenchymal stem cell increase the survival and gene expression of engineered neural stem cells in a spinal cord injury model. *Neurosci. Lett.* 2010; 472 (3): 215–219.
  82. De Barros S., Dehez S., Arnaud E., et al. Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol. Ther.* 2013; 21 (2): 399–408.
  83. Stubbs S.L., Hsiao S.T., Peshavariya H.M. et al. Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dev.* 2012; 21 (11): 1887–1896.
  84. Jaussaud J., Biais M., Calderon J. et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells improve cardiac function in a swine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2013; 43 (5): 1050–1057.
  85. Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003; 114 (6): 763–776.
  86. Messina E., De Angelis L., Frati G. et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 2004; 95 (9): 911–921.
  87. Dawn B., Stein A.B., Urbanek K. et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102 (10): 3766–3771.
  88. Davis D.R., Zhang Y., Smith R.R. et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One.* 2009; 4 (9): e7195.
  89. Yan F., Yao Y., Chen L. et al. Hypoxic preconditioning improves survival of cardiac progenitor cells: role of stromal cell derived factor-1 $\alpha$ -CXCR4 axis. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e37948.
  90. Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K. et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012; 379 (9819): 895–904.
  91. Bolli R., Chugh A.R., D'Amario D. et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2011; 378 (9806): 1847–1857.

#### FOR CORRESPONDENCE

**Maslov Leonid Nikolaevich**, PhD, professor, Head of Laboratory of Experimental Surgery, Federal State Budget Institution “Research Center of Cardiology”, Siberian Department of Russian Academy of Medical Sciences.

**Address:** 111, Kievskaya Street, Tomsk, RF, 634012; **tel.:** +7 (3822) 26-21-74; **e-mail:** maslov@cardio.tsu.ru

**Podoksenov Yuriy Kirillovich**, PhD, Head of the Department of Anesthesiology and Resuscitation, Federal State Budget Institution “Scientific Research Center of Cardiology”, Siberian Department of Russian Academy of Medical Sciences

**Address:** 111, Kievskaya Street, Tomsk, RF, 634012; **tel.:** +7 (3822) 26-21-74; **e-mail:** uk@cardio-tomsk.ru

**Portnichenko Alla Georgievna**, MD, senior research scientist of the Department of Common and Molecular Pathophysiology of A.A. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Ukraine

**Address:** 4, Bogomoltsa str., Kiev, Ukraine; **e-mail:** port@serv.biph.kiev.ua

**Naumova Anna Vladimirovna**, MD, research scientist of the Department of Radiology, Washington University.

**Address:** Seattle, USA; **e-mail:** anabella1710@gmail.com